海藻糖-6 磷酸合成酶（TPS）试剂盒说明书

（货号：G0556W 微板法 48 样）

一、产品简介：

海藻糖-6磷酸合成酶（TPS，EC 2.4.1.15）是海藻糖合成的关键酶之一，催化UDP-葡萄糖和葡萄糖-6磷酸生成海藻糖-6磷酸和UDP。UDP与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的逐一作用下，使NADH氧化为NAD^+，通过检测NADH在340nm处的下降量来计算TPS的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 19mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.3mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂五	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂六	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱/金属浴、可调式移液器、研钵、冰。

四、海藻糖-6磷酸合成酶（TPS）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/真菌样本：

先收集细菌或真菌到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或真菌加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000rpm 室温（25℃）离心 10min，取上清。

【注】：若增加样本量，可按照提取液体积(mL)：细菌或真菌数量(10^4）个为 1:500~1000 的比例提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	
试剂二	70	80
混匀，35℃孵育 30min 后，立即于 95-100℃煮沸 5min，10000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。		

④ 试剂二和三和四和五和六可按照 100:10:10:10:10 比例配成混合液（一枪加 140μL）（**用多少配多少，现配现用**），在 96 孔板中依次加入：

试剂二	100	100
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
③的上清液	60	60
混匀，35℃下立即于 340nm 处读取各管吸光值 A1，30min 后读取 A2。△A=(A1-A2)测定-(A1-A2)对照。		

【注】 1.若△A 小于 0.01，可以适当延长③步的反应时间 T 到 60min 或更长。或适当加大样本量 V1（如 50μL，则试剂二相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

2.若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的样本）或ΔA 的值大于 0.4，可以适当减少③的上清液加样量 V3（如减少至 40μL，则试剂二相应增加），则改变后的加样体积 V3 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/mg prot)=$[\Delta A\times V4\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\times(V2\div V3)\div(V1\times Cpr)\div T=178.6\times\Delta A\div Cpr$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

TPS 活力(nmol/min/g 鲜重)=$[\Delta A\times V4\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\times(V2\div V3)\div(W\times V1\div V)\div T=178.6\times\Delta A\div W$

3、按细菌或真菌数量计算：

TPS 活力(μg/10^4cell)=$[\Delta A\times V4\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\times(V2\div V3)\div(500\times V1\div V)\div T=0.357\times\Delta A$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---第③步的反应总体积，0.1mL；

V3---第④步中所取上清液体积，0.06mL；

V4---反应体系总体积，2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；

W---样本质量，g；

500---细菌或真菌总数，万；

T---反应时间，30min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。